

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

15.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2002年 4月15日

出 願 番 号
Application Number:

特願2002-112369

[ST.10/C]:

[JP2002-112369]

出 願 人
Applicant(s):

中外製薬株式会社

REC'D 06 JUN 2003

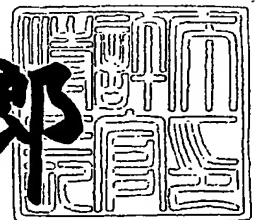
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月20日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3036768

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-A0203

【提出日】 平成14年 4月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社
社内

 【氏名】 小嶋 哲郎

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 s c D b ライブラリーの作成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 2つの抗体可変領域をコードし、一方の抗体可変領域と他方の抗体可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子。

【請求項 2】 リンカーに制限酵素切断部位が2つ以上存在することを特徴とする請求項 1 記載の遺伝子。

【請求項 3】 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である請求項 1 または 2 記載の遺伝子。

【請求項 4】 2つの抗体可変領域が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか記載の遺伝子。

【請求項 5】 2つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子。

【請求項 6】 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である請求項 5 記載の遺伝子。

【請求項 7】 2つの抗体可変領域をコードする遺伝子が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項 5 または 6 記載の遺伝子。

【請求項 8】 4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在することを特徴とする遺伝子。

【請求項 9】 1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間が短いリンカーで結ばれ、2番目と3番目の抗体可変領域の間が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝子。

【請求項 10】 4つの抗体可変領域が第一の抗原に対する重鎖可変領域、第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗原に対する軽鎖可変領域である請求項 8 ～ 9 記載の遺伝子。

【請求項 11】 第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗体に対する軽鎖可変領域、第一の抗原に対する重鎖可変領域の順に並んでいる請求項 10 記載の遺伝子。

【請求項 12】 以下の工程を含む二特異性単鎖ダイアボディをコードする遺伝子の作成方法

- (a) 請求項 1～4 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
 - (b) 請求項 5～7 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
 - (c) (b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、
- を含む方法。

【請求項 13】 請求項 1～11 いずれかの記載の遺伝子によりコードされるペプチド。

【請求項 14】 請求項 1～11 のいずれか記載の遺伝子を含む抗体ライブラリー。

【請求項 15】 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法。

- (a) 第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素部位を含む長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (b) 第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域が長いリンカーで結ばれ、それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に制限酵素部位が存在している抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (c) (a)及び(b)で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (d) 上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間に、第二の抗原に対する重鎖可変領域と軽鎖可変領域が挿入されたフラグメントを作成する工程。

【請求項 16】 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法

- (a) 請求項 1～4 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、
- (b) 請求項 5～7 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (c) (b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程。

【請求項 1 7】 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、

- (a) 抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が 2 つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、
- (b) 上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び
- (c) 上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程。

【請求項 1 8】 請求項 1 ～ 1 1 いずれか記載の遺伝子を含む発現ベクター

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、単鎖ダイアボディ (single chain diabody; scDb) ライブラリー及びその作成方法に関する。また、本発明は該単鎖ダイアボディライブラリーを構成する遺伝子、及び、該遺伝子を含む発現ベクター、並びに、それらの作成方法に関し、さらに、該遺伝子によりコードされるペプチドに関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

異なる抗原に結合することができる多特異性抗体 (例えば、二特異性抗体 (BsAb)) は免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。多特異性抗体は、例えば、酵素免疫分析で用いられる酵素を固定化する際に利用することができる。即ち、多特異性抗体の一方の腕を酵素上の酵素反応を阻害しない部分のエピトープと結合するように、そしてもう一方の腕は固定化する担体上に対して結合するように設計し、担体上に酵素を抗体を介して結合する (例えば、Hammerling et al., J.Exp.Med. 128: 1461-1473 (1968))。また、多特異性抗体を癌等の様々な疾病の免疫診断において利用する方法も報告されている (Songsivilai et al., Clin.Exp.Immunol. 79: 315 (1990))。癌の診断において

使用される二特異性抗体は、例えば、抗体の一方の腕が腫瘍関連抗原を認識するように設計され、他方は検出可能なマーカーに結合するように設計される(例えば、LeDoussal et al., Int.J.Cancer Suppl. 7: 58-62 (1992); Le Doussal et al., J.Nucl.Med. 34: 1662-1671 (1993); Stickney et al., Cancer Res. 51: 6650-6655 (1991))。

【0003】

さらに、病原体または腫瘍細胞に対する患者の細胞性免疫応答の誘発において多特異性抗体を利用する方法も知られている(Segal et al., Chem.Immunol. 47: 179 (1989); Segal et al., Biologic Therapy of Cancer 2(4) De Vita et al. eds., J.B.Lippincott, Philadelphia (1992) p.1; Hsieh-Ma et al., Cancer Res. 52: 6832-6839 (1992); Weiner et al., Cancer Res. 53: 94-100 (1993))。また、多特異性抗体はT細胞の細胞を殺す作用を誘起するように設計することもできる(Shalaby et al., J.Exp.Med. 175(1): 217 (1992); de Liji et al. "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds., Lienhart (1991)p.249; Clark et al. "Bispecific Antibodies and Targeted Cellular Cytotoxicity", Romet-Lemonne, Fanger and Segal Eds. Lienhart (1991)p.243; Kroesen et al., Cancer Immunol.Immunother. 37: 400-407 (1993); Kroesen et al., Br.J.Cancer 70: 652-661 (1994); Weiner et al., J.Immunol. 152: 2385 (1994))。その他、多特異性抗体は、繊維素溶解剤またはワクチンのアジュバントとしても利用し得るし、感染性の疾患(例えば、HIV、インフルエンザ、原生虫等に感染した細胞を標的として)の治療用、腫瘍細胞へ抗毒素の運搬、及び、細胞表面受容体へ免疫複合体を作用させるためにも利用することができる(Fanger et al., 上述)。

【0004】

従来、多特異性抗体は、(1)異なる特異性を有する抗体の異種二機能性リンカーによる化学的カップリング(Paulus, Behring Inst.Mitt., 78:118-132 (1985))、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞の融合 (Millstein and Cuello, Nature 305: 537-539 (1983))、及び(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種類の遺伝子)のマウス骨髓腫細胞または他の真核

細胞発現系へのトランスフェクションとそれに続く二特異性の一価部分の単離(Zimmermann, Rev.Physio.Biochem.Pharmacol. 105: 176-260 (1986); Van Dijk et al., Int.J.Cancer 43: 944-949 (1989))等の方法により製造されてきた。

【0005】

ダイアボディ(Db)は、遺伝子融合により構築された二価(bivalent)の抗体断片である(P.Holliger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90: 6444-6448 (1993)、E P404,097号、W093/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、ポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中で軽鎖可変領域(VL)及び重鎖可変領域(VH)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖V領域フラグメント(scFv)を形成することが出来ず二量体を形成するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。このとき2つの異なる抗原(a、b)に対するVLとVHをVL_a-VH_bとVL_b-VH_aの組合わせで5残基程度のリンカーで結んだものを同時に発現させると二特異性Dbとして分泌される。二特異性Dbは多特異性抗体の一種である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

二特異性Dbにおいては、2種類の鎖の汲み合わせは3通りあるため、得られる二特異性Dbは全体の50%に留まる。一方、ファージ抗体ライブラリーを用いて抗原との反応性により特定の遺伝子を選択するためには、抗原結合部位をscFvとして提示させるためにVHとVLを15残基程度のリンカーで結合して発現させる必要がある。このように抗原との結合性により選択されたファージ抗体ライブラリー由来のscFvのVHとVLを二特異性scDbとして発現させるためには、リンカーの長さをscFvの発現に必要とされる15残基程度のものから、Dbの発現を可能にする5残基程度の長さのリンカーに換えるためのPCRアセンブル等の煩雑な操作が必要となり、一括処理することは困難であった。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明により、新規な二特異性scDbライブラリーの構築法が提供される。本発

明においては、二特異性Dbを確実に生産できるよう、2つの異なる抗原(a、b)に対するVLとVHをVL_a-VH_b-VL_b-VH_aの順に、VH_bとVL_bの間は15残基以上のリンカーで結んだ単鎖として発現させる。本発明では、このようなポリペプチド鎖(VL_a-VH_b-VL_b-VH_a)を発現する二特異性scDbライブラリーをscFvのファージライブラリーから一括処理により作成することができる。即ち、2つの抗体可変領域(VL_aとVH_a)をコードするヌクレオチドが制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれた遺伝子、及び、2つの抗体可変領域(VL_bとVH_b)をコードするヌクレオチドが長いリンカーにより結ばれ、可変領域をコードするヌクレオチドのリンカーと結合されていない側に制限酵素切断部位を有する遺伝子を用い、これらを制限酵素で処理した後、VL_aとVH_aの間にVL_b及びVH_bが挟まれるように結合させる。本発明は、このような二特異性scDbライブラリーの構築法に加え、該方法に用い得る遺伝子、該方法により得られる遺伝子、これらの遺伝子を含む発現ベクターまたは抗体ライブラリー、及び、該遺伝子によりコードされるペプチドを提供する。

【 0 0 0 8 】

また、本発明では、抗原との結合で選択されたscFvのVHとVLを二特異性scDbとして一括処理で発現させる方法として、ファージ抗体ライブラリーからパンニング等によって濃縮した抗体クローンを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提案する。より詳細には、本発明は、

- (1) 2つの抗体可変領域をコードし、一方の抗体可変領域と他方の抗体可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、
- (2) リンカーに制限酵素切断部位が2つ以上存在することを特徴とする(1)記載の遺伝子、
- (3) 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域である(1)または(2)記載の遺伝子、
- (4) 2つの抗体可変領域が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(1)～(3)いずれか記載の遺伝子、
- (5) 2つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子、
- (6) 2つの抗体可変領域の一方が重鎖可変領域であり、他方が軽鎖可変領域で

ある(5)記載の遺伝子、

(7) 2つの抗体可変領域をコードする遺伝子が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(5)または(6)記載の遺伝子、

(8) 4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在することを特徴とする遺伝子、

(9) 1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間が短いリンカーで結ばれ、2番目と3番目の抗体可変領域の間が長いリンカーで結ばれていることを特徴とする(8)記載の遺伝子、

(10) 4つの抗体可変領域が第一の抗原に対する重鎖可変領域、第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗原に対する軽鎖可変領域である(8)または(9)記載の遺伝子、

(11) 第一の抗原に対する軽鎖可変領域、第二の抗原に対する重鎖可変領域、第二の抗体に対する軽鎖可変領域、第一の抗原に対する重鎖可変領域の順に並んでいる(10)記載の遺伝子、

(12) 以下の工程を含む二特異性単鎖ダイアボディーをコードする遺伝子の作成方法

(a) (1)～(4)記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、

(b) (5)～(7)記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c)(b)の工程で作成した遺伝子を、(a)の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、

を含む方法、

(13) (1)～(11)いずれかの記載の遺伝子によりコードされるペプチド

(14) (1)～(11)のいずれか記載の遺伝子を含む抗体ライブラリー、

(15) 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、

(a)第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素部位を含む長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

(b)第二の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域が長いリンカーで結ばれ、

それぞれの可変領域のリンカーが付加していない側に制限酵素部位が存在している抗体ファージライブラリーを作成する工程、

(c) (a) 及び (b) で作成したファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、

(d) 上記処理により得られたフラグメントをライゲーションすることにより、第一の抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域の間に、第二の抗原に対する重鎖可変領域と軽鎖可変領域が挿入されたフラグメントを作成する工程、

(16) 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法

(a) (1) ～ (4) 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、

(b) (5) ～ (7) 記載のいずれかの遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c) (b) の工程で作成した遺伝子を、(a) の工程で作成した遺伝子の間に挿入する工程、

(17) 以下の工程を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法、

(a) 抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が2つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程、

(b) 上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c) 上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程、並びに

(18) (1) ～ (11) いずれか記載の遺伝子を含む発現ベクターに関する。

【0009】

本発明の方法は、二特異性scDbのみならず一特異性scDbのスクリーニングにも応用できる。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明のscDbライブラリーの作成方法においては、例えば、まず図1に示すように、抗原Aを免疫した動物の脾臓等からVL-VHの順につないだ抗体ファージライ

ブラリーを構築する。抗体ファージライブラリーは、公知の方法に従って構築することができる(例えば、McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991); Marks et al., J.Mol.Biol. 222: 582-597 (1991)等参照)。

【0011】

動物を免疫化する抗原としては、免疫原性を有する完全抗原と、免疫原性を有さない不完全抗原(ハプテンを含む)が挙げられる。蛋白質、ポリペプチド、多糖類、核酸、脂質等からなる物質が抗原として挙げられ、本発明において、特に抗原を構成する物質の種類は限定されない。動物を免疫するのに用いる免疫原としては、場合により抗原となるものを他の分子に結合させ可溶性抗原とすることも可能であり、また、場合によりそれらの断片を用いてもよい。受容体のような膜貫通分子を抗原として用いる場合、これらの断片(例えば、受容体の細胞外領域)を用いるのが好ましい。また、膜貫通分子を細胞表面上に発現する細胞を免疫原とすることもできる。このような細胞は天然(腫瘍セルライン等)由来、または、組換え技術により膜貫通分子を発現するように構成された細胞であり得る。

【0012】

二特異性Dbは、従来知られている二特異性抗体と同様に使用することができるものである。そこで癌の治療を目的として、例えば、一方の腕を腫瘍細胞抗原を認識するようにし、他方が細胞傷害性を誘起する分子を認識するように設計することができる。この場合、腫瘍細胞抗原としては例えばCD15、p185^{HER2}、1D10(悪性B細胞)、p97、腎細胞癌、OVCAR-3、L-D1(大腸癌)、メラノサイト刺激ホルモンアナログ、EGF受容体、CAMA1、MoV18、CD19、神経細胞接着分子(neural cell adhesion molecule; NCAM)、葉酸結合蛋白質(FBP)、AMOC-31 (pan carcinoma associated antigen)、Id-1、CD22、CD7、CD38、CEAを選択することができる。また、細胞傷害性を誘起する分子としては、Fc γ RI、CD16、CD3等を挙げることができる。また、上述の細胞障害性を誘起する分子に代えて、例えば、サポニン、リシンのA鎖、IFN- α 、ピンカアルカロイド等の毒素と結合するようにDbを設計することもできる。このような二特異性Dbは癌の治療において特に有用である。

又、二特異性Dbはアゴニスト抗体としても有用である。例えば、多くのサイト

カイン受容体ではホモ又はヘテロ二量体を形成しており、リガンドが結合することによって二量体を形成する鎖間の距離・角度が変化して細胞内にシグナルを伝えうるようになると考えられている。従って、このような二量体を形成する受容体に結合する二特異性Dbは、リガンドによる受容体の二量体化を模倣でき、アゴニストDbとなり得る。

【0013】

その他の二特異性Dbとしては、(1)CD30及びアルカリホスファターゼに結合し、その結果、リン酸マイトマイシンをマイトマイシンアルコールに変換するDb等、物質の変換を助ける酵素を伴うもの、(2)繊維素溶解剤として用い得る、フィブリン、tPA、uPA等に結合するDb、(3)LDL及びFc受容体(Fc γ RI、Fc γ RIIまたはFc γ RIII)等に結合し免疫複合体を細胞表面受容体へ誘導するDb、(4)CD3等のT細胞上の抗原と、HCV、インフルエンザ、HIV等の病原菌の抗原を認識する感染性の疾患に用い得るDb、(5)腫瘍の検出に用い得る腫瘍抗原と、EOTUBE、DPTA、ハプテン等の検出可能な物質に結合性を有するDb、(6)ワクチンアジュバントとして用い得るDb(Fanger et al., Crit.Rev.Immunol. 12: 101-124 (1992)参照)、並びに(7)診断において使用し得るウサギIgG、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、FITC、 β -ガラクトシダーゼ等の検出可能な物質と、ホルモン、フェリチン、ソマトスタチン、サブスタンスP、CEA等を抗原とするDbが挙げられる。しかしながら、本発明のDbはこれらに限定されるものではない。

【0014】

次に抗原を用いて適当な哺乳動物を免疫する。例えば、マウス、ハムスター、またはアカゲザル等の動物を免疫化に使用することができる。また、in vitroにおいてリンパ球を免疫化することもできる。その後、免疫化された動物の脾臓またはリンパ球中に含まれる抗体をコードするDNAを、慣用の方法(例えば、抗体重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるヌクレオチドプローブ等を用いる方法)により単離する。

【0015】

本発明における、H鎖及びL鎖可変領域とは、免疫グロブリンのH鎖及びL鎖のうち、N末端から通常約110残基のアミノ酸からなる部分を指す。免疫グロブリンは

、異なるクラス(IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM)に分類され、さらにこれらは幾つかのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG-1、IgG2、IgG-3、及びIgG-4、並びにIgA-1、及びIgA-2等)に分類されるが、本発明のH鎖及びL鎖可変領域は、これらいずれのクラス及びサブクラスに属するものであってもよく、特に限定されない。

【0016】

さらに、本発明の抗体可変領域は所望の抗原との結合性を有している限り、より短いまたは改変された抗体断片であってもよい。「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位とを含むものである。この領域は1つのH鎖及びL鎖の可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。各可変領域中に存在する3つの相補性決定領域(超可変部;CDR)が相互作用し、ダイマーの表面上に抗原結合部位を形成している。即ち、H鎖とL鎖をあわせて6つのCDRが抗体の抗原結合部位として機能している。しかしながら、1つの可変領域であっても全結合部位を含む場合よりは低い親和性ではあるものの、抗原を認識し、結合する能力を有していることが知られている。従って、本発明におけるDbを構成する抗体可変領域は、Fv断片が特に好ましいが、これに限定されるものではなく、H鎖またはL鎖のCDRが保存され抗原を認識し、結合する能力を有する領域であればよい。

【0017】

また、遺伝子工学的に非ヒト哺乳動物(マウス、ラット、ハムスター等)由来のモノクローナル抗体のCDR以外の部分をヒト免疫グロブリン由来の可変領域の枠組構造配列に置き換え「ヒト化抗体」とする技術が公知である(例えば、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); Presta Curr.Op.Struct.Biol. 2: 593-596 (1992)参照)。ヒト化抗体は、レシピエント抗体に導入させたCDRまたは枠組構造配列のどちらにも含まれないアミノ酸残基を含んでいてもよい。通常、このようなアミノ酸残基の導入は、抗体の抗原認識・結合能力をより正確に至適化するために行われる。本発明の可変領域はヒト化等の改変された可変領域も包含する。

【0018】

その他の可変領域を、抗原との結合性等の抗体の生物学的特性を改善するために改変することもできる。このような改変は、部位特異的変異(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985)参照)、PCR変異、カセット変異等の方法により行うことができる。一般に、生物学的特性の改善された抗体変異体は70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上(例えば95%以上)のアミノ酸配列相同性・類似性を元となった抗体H鎖またはL鎖の可変領域のアミノ酸配列と有する。本明細書において、配列の相同性・類似性は、配列相同性が最大の値を取るように必要に応じ配列を整列化、及びギャップ導入した後、元となった抗体残基と相同(同じ残基)または類似(一般的なアミノ酸の側鎖の特性に基づき同じグループに分類されるアミノ酸残基)するアミノ酸残基の割合として定義される。

【 0 0 1 9 】

通常、天然のアミノ酸残基は(1)疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、(2)中性親水性：システイン、セリン、スレオニン、アスパラギン及びグルタミン、(3)酸性：アスパラギン酸及びグルタミン酸、(4)塩基性：ヒスチジン、リシン及びアルギニン、(5)鎖の配向に影響する残基：グリシン及びプロリン、並びに(6)芳香族性：トリプトファン、チロシン及びフェニルアラニンのグループに各々のアミノ酸の側鎖の性質に基づき分類される。

【 0 0 2 0 】

続いて、単離した重鎖及び軽鎖のDNAを間に20残基程度の長さのリンカーを用い結合し、適当なファージベクターに組み込み、ファージライブラリーを作成する。このとき、リンカーの中に、例えば制限酵素BamHI、AccIII等の認識配列を配しておく。このようなリンカーとしては、例えば以下のような配列を有するものを例示することができる：

BamHI

AccIII

GGTGGTGGTGGATCCGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGTGGTGGTTCT (配列番号：1)

CCACCACCACCTAGGCCACCACCACCAAGACCGCGCGCGGAGGCCTCCACCACCAAGA

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (配列番号：2)

【 0 0 2 1 】

その他、本発明において使用し得る制限酵素認識配列としては、例えばBamHI、AccIII、AluI、EcoRI、HincII、HindIII、HinfI、NotI、SacI、SalI、Sau3AI、SmaI、TaqI、XbaI、AatI、BclI、BstEII、EheI、KpnI、NheI、PstI、PvuII、SfiI、BglI、HaeIII、HhaI、HpaII、XhoI等が挙げられる。

また、ファージライブラリーを構成するファージとしては、G4ファージ、M13ファージ、fdファージ、f1ファージ、 λ ファージ、T4ファージ、T7ファージ、P1ファージ、MS2ファージ、 Φ Kファージ、 Φ X174ファージ、 λ gWES、 λ B、Charon 4A、Charon30等を例示することができる。

【0022】

同様にして抗原Aとは異なる抗原、または同じ抗原(例えば、エピトープが異なる場合など)により動物またはリンパ球を免疫化し、抗体の重鎖または軽鎖をコードするDNAを単離し、20残基程度の長さのリンカーを用いVH-VLの順につないだ抗体ファージライブラリーを構築する。このとき、抗原Aに結合するVL_aとVH_aとをコードする遺伝子の間に、抗原Bに結合するVH_b及びVL_bをコードする遺伝子を挿入することができるようにVH_bの5'末端、及びVL_bの3'末端に制限酵素により認識される配列を設ける。即ち、抗原Aについてのライブラリーを制限酵素BamHI、AccIII等の認識配列を配して作成した場合には、VHの5'末端にはBamHIを、VLの3'末端にはAccIIIを配しておく。

【0023】

次に、上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子(例えば、パンニング等で濃縮したそれぞれのライブラリーのファージミド(例えば、Vaughan et al., Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996)参照)あるいは上記ファージライブラリーからPCRを用いて増幅した遺伝子など)を、リンカー並びにVL及びVHをコードする遺伝子の末端に配置した制限酵素、例えば上記BamHIとAccIIIの認識部位を含むリンカーを用いた場合には、BamHIとAccIIIで処理する。得られた抗原Bに対する抗体のVH-VL断片をコードする遺伝子を抗原Aに対する抗体ファージミドのBamHIとAccIIIの間に挿入する。これによって抗A抗体と抗B抗体の様々な組み合わせのdiscDbのライブラリーが構築できる。

【 0 0 2 4 】

本発明において、「リンカー」は、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されず、制限酵素切断部位を有していても、有していなくてもよい。ここで、「長いリンカー」とは、抗体のH鎖可変領域とL鎖可変領域が該リンカーを結んでファージライブラリー上に発現させた場合に、scFvとして提示される長さのリンカーのことを意味する。その鎖長は特に制限されないが、好ましくは30～150bpの鎖長を有し、さらに好ましくは36～90bpの鎖長を有し、特に好ましくは45～60bpの鎖長を有する。また、「短いリンカー」とは、抗体のH鎖可変領域とL鎖可変領域を該リンカーで結んで発現させた場合に、二量体(diabody:Db)を形成するリンカーのことを意味し、その鎖長は特に制限されないが、好ましくは6～27bpの鎖長を有し、さらに好ましくは9～21bpの鎖長を有し、特に好ましくは12～18bpの鎖長を有する。

【 0 0 2 5 】

さらに、VL_a及びVH_aをコードする遺伝子のリンカーとは逆側の部分にも適当な制限酵素認識部位を設けておくことによりVL_a-VH_b-VL_b-VH_aをコードする断片を切出し、適当な発現ベクターへ挿入し、発現させ、その生物活性を指標に目的とするDbをコードする遺伝子をスクリーニングすることができる。例えば、上述のように抗原A及び抗原Bに対するファージ抗体ライブラリーにおいてBamHI及びAccIIIを用いている場合には、図1において示すようにSfiI等の別の制限酵素を用いて適当な発現ベクターに挿入することが出来る。指標とする生物活性としては、例えば、抗原と特異的に結合する活性が挙げられ、抗原の種類によっては阻害活性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性等も挙げられる。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築したbiscDbライブラリーについては、レトロウイルスベクター等のベクターに挿入し、目的サイトカイン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニストbiDbを選択することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明のDbを発現させるための発現系を構築するための手順および宿主に適合した組換えベクターの構築は遺伝子工学の分野において慣用の技術を用いて行うことができる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Har

bor Laboratories (1989)等参照)。宿主細胞としては、細菌等の原核生物、並びに、酵母、動物細胞、昆虫細胞及び植物細胞等の真核細胞等、本発明のDbを発現できる細胞であればいずれも用いることができる。特に、グリコシル化の点から考えると哺乳動物細胞が好ましい。

【 0 0 2 7 】

発現ベクターは、遺伝情報の転写及び翻訳を制御するプロモーター、ターミネーター等のユニットを含む必要がある。例えば、大腸菌等のエシェリシア属の微生物を宿主細胞とする場合、プラスミドベクターとしてpBR、pUC系プラスミドを利用することができlac、trp、tac、trc、 λ ファージPL、PR等に由来するプロモーターが利用可能である。また、ターミネーターとしてはtrpA由来、ファージ由来、rrnBリボソーマルRNA由来のものを利用することができる。枯草菌等のバチルス属の微生物を宿主とする場合については、pUB110系、pC194系等のプラスミドが知られており、場合により遺伝子を染色体にインテグレートすることもできる。プロモーター・ターミネーターとしてapr、npr、amy等由来のものが利用できる。その他、原核細胞としてはシュードモナス属(例えば、*Pseudomonas putida*, *P. cepacia*等；pKT240等のベクター)、ブレヴィバクテリウム属(例えば、*Brevibacterium lactofermentum*；pAJ43等)、コリネバクテリウム属(例えば、*Corynebacterium glutamicum*等；pCS11、pCB101等)、ストレプトコッカス属(pHV1301、pGK1等)、ラクトバチルス属(pAM β 1等)、ロドコッカス属(*Rhodococcus rhodochrous*等より単離されたプラスミド(J.Gen.Microbiol. 138: 1003 (1992))等)、ストレプトマイセス属(例えば、*Streptomyces lividans*, *S. virginiae*等；pIJ486、pKC1064、pUWL-KS等)、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属(*Salmonella typhimurium*等)、セラチア属(*Serratia marcescans*)、シゲレラ属に属する微生物が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

真核微生物の発現系としては、*Saccharomyces cerevisiae*を宿主とし、YRp系、YEp系、YCp系、YIp系のプラスミドを用いた系が知られている。また、ADH、GAPDH、PHO、GAL、PGK、ENO等のプロモーター・ターミネーターが利用可能である。その他、クライベロマイセス属(例えば、*Kluyveromyces lactis*等；2 μ m系、pK

D1系、pGKI1系、KARS系等のプラスミド)、シゾサッカロマイセス属(例えば、Schizosaccharomyces pombe等；pAUR224等)、チゴサッカロマイセス属(例えば、Zygosaccharomyces rouxii等；pSB3、及び、S.cerevisiae由来PH05プロモーター等)、ハンゼヌラ属(例えば、Hansenula polymorpha等)、ピキア属(例えば、Pichia pastoris等)、カンディダ属(例えば、Candida maltosa, Candida tropicalis, Candida utilis, Candida albicans等)、アスペルギルス属(例えば、Aspergillus oryzae, Aspergillus niger等)、及びトリコデルマ属(例えば、Trichoderma reesei等)等を本発明の発現ベクター系において用いることができる。

【 0 0 2 9 】

その他、植物細胞を宿主として用いることもできる。例えば、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、トマト、ダイズ、ペチュニア、及びタバコ等由来の植物細胞を宿主とすることができる。特に良く知られた系としてNicotina tabacum由来の細胞を用いたものが知られており、これをカルス培養すればよい。植物を形質転換する際には、例えば、pMON530等の発現ベクターを用い、該ベクターをAgrobacterium tumefaciens等の細菌に導入する。この細菌をタバコ(例えば、Nicotina tabacum)に感染させると、所望のポリペプチドをタバコの葉等から得ることができる。

【 0 0 3 0 】

カイコ(Bombyx mori)、カ(Aede aegypti, Aedes albopictus)、ショウジョウバエ(Drosophila melanogaster)等の昆虫細胞を宿主として用いることも可能である。例えば、カイコを用いる場合、DbをコードするDNAをバキュロウイルスベクター等に挿入し、該ウイルスをカイコに感染させることによりカイコの体液から目的のポリペプチドを得ることができる(Nature 315: 592-594 (1985))。

【 0 0 3 1 】

動物細胞を宿主として用いる場合には、例えば、pME18S(Med.immunol. 20: 27-32 (1990))、pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCDM8(Nature 329: 840-842 (1987))、pRSVneo、pSV2-neo、pcDNAI/Amp(Invitrogen)、pcDNAI、pAMoERC3Sc、pCDM8(Nature 329: 840 (1987))、pAGE107(Cytotechnology 3: 133 (1990))、pREP4(Invitrogen)、pAGE103(J.Biochem. 101: 1307 (1987))、pAMoA

、pAS3-3、pCAGGS(Gene 108: 193-200 (1991))、pBK-CMV、pcDNA3.1(Invitrogen)、pZeoSV(Stratagene)等が発現ベクターとして挙げられる。プロモーターとしては、サイトメガロウイルスのIE遺伝子のプロモーター及びエンハンサー、SV40の初期プロモーター、RSV、HIV及びMMLV等のレトロウイルスのLTR、メタロチオネイン β -アクチン、伸長因子1、HSP等の動物細胞由来の遺伝子のプロモーター等を挙げることができる。その他、上述のようにウイルスベクターを用いることもできる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、HIV等のDNA及びRNAウイルスが挙げられる。

【0032】

動物細胞宿主としては、マウス・ミエローマ細胞(例えば、SP2/0、NS0等)、ラット・ミエローマ細胞(例えば、YB2/0等)、マウス・ハイブリドーマ細胞、Nm1w a細胞(KJM-1細胞等も含む)、ヒト胎児腎臓細胞(293細胞等)、ヒト白血病細胞(BALL-1等)、CHO細胞、COS細胞(COS-1、COS-7等)、ハムスター胎児腎臓細胞(BHK等)、マウスセルトリ細胞(TM4等)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76等)、HBT637細胞、HeLa細胞、ウサギ腎臓細胞(MDCK等)、ヒト肝臓細胞(HepG2等)、マウス乳癌細胞(MMT060562細胞)、TRI細胞、MRC細胞、FS3細胞等がある。

【0033】

発現ベクターの導入方法としては、宿主及びベクターの種類に依存するが、細胞にDbをコードするDNAを導入できる方法であれば、いずれも用いることができる。原核細胞へベクターを導入する方法としては、カルシウムイオンを用いる方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 69: 2110 (1972))、プロトプラスト法(特開昭63-24829号公報)、エレクトポレーション法(Gene 17: 107 (1982); Molecular & General Genetics 168: 111 (1979))等があり；酵母への導入方法としては、エレクトポレーション法(Methods in Enzymology, 194: 182 (1990))、スフェロプラスト法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81: 4889 (1984))、酢酸リチウム法(J.Bacteriol. 153: 163 (1983))等があり；植物細胞についてはAgrobacterium法(Gene 23: 315 (1983); W089/05859等)や、超音波処理による方法(W091/00358)等が知られる。

；動物細胞ベクターを導入する方法としてはエレクトポレーション(Cytotechnology 3:133 (1990))、リン酸カルシウム法(特開平2-227075号公報)、リポフェクション法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84: 7413 (1987); Virology 52: 456 (1973))、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法等が挙げられる。

【0034】

上述のようにして取得された形質転換体は、例えば、以下の方法で培養することができる。

形質転換体が原核生物や真核微生物である場合は、培地は該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等の生育に必要な物質を含有し、形質転換体の効率的な培養を可能にするものであれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。培養は好氣的条件、嫌氣的条件のいずれで行ってもよく、生育温度、培地のpH、生育時間等の条件は、用いる形質転換体の種類に応じ適宜当業者により決定され得るのである。また、誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターについては、必要に応じてインデューサーを培地に添加すればよい(例えば、lacプロモーターであればIPTG、trpプロモーターであればIAA等)。

【0035】

昆虫細胞を宿主細胞として用いる場合には、培地としてはTNM-FH培地(Pharmin gen)、Sf-900 II SFM培地(Life Technologies)、ExCell400及びExCell405(JRH Biosciences)、Grace's Insect Medium(Nature 195: 788 (1962))等を用いることができ、必要に応じゲンタマイシン等の抗生物質を添加してもよい。

【0036】

形質転換体が動物細胞である場合には、一般に使用されているRPMI1640培地(The Journal of American Medical Association 199: 519 (1967))、EagleのMEM培地(Science 122: 501 (1952))、DMEM培地(Virology 8: 396 (1959))、199ばいし(Proceeding of the Society for the Biological Medicine 73: 1 (1950))、または、これらの培地にBSA等を添加した培地を使用することができる。培養は通常の条件、例えば、pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下で行うことができる。この際、必要に応じカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよ

い。

【0037】

このようにして得られた本発明のDbは、宿主細胞内、または、シグナル配列を用いて細胞外に分泌させた場合には培地等から単離し、実質的に純粋なポリペプチドとして精製することもできる。ポリペプチドの分離、精製は、一般的に使用される、クロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈澱、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、透析、再結晶等の方法を適宜選択し、必要に応じて組合せることにより行うことができる。クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Course Manual, Harlow and David Lane eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988))。これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、本発明のDbは抗原に対して結合することから、抗原への結合性を利用して精製することも可能である。

【0038】

さらに、本発明は上述のscDbライブラリーの作成方法において用いることができる、(I)2つの抗体可変領域をコードし、一方の可変領域が他方の可変領域が制限酵素切断部位を有するリンカーで結ばれている遺伝子、及び(II)2つの抗体可変領域をコードし、その両端に制限酵素切断部位を付加した遺伝子に関する。これらの本発明のscDbライブラリーの作成における材料となる遺伝子の可変領域は好ましくは、scFvとして発現されるように重鎖可変領域と軽鎖可変領域とが長いリンカーで結合されているものである。このような遺伝子は、(I)または(II)を含む発現ベクターをバクテリオファージコート蛋白質融合(Smith, Science 228: 1315 (1985); Scott and Smith, Science 249: 386 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 309 (1990); Devlin et al., Science 249: 404 (1992))

90); Wells and Lowman, Curr.Opin.Struct.Biol. 2: 597 (1992); 米国特許ダイ 5,223,409号)等の方法によりファージ粒子表面上にディスプレイさせ、ディスプレイされたペプチドの表現型により選択することにより、それをコードする遺伝子も同時に得られるという点で有利である。

【 0 0 3 9 】

(I)及び(II)の遺伝子、または、該遺伝子を含む抗体ライブラリーを制限酵素処理し、連結することで本発明の4つの抗体可変領域をコードし、1番目の抗体可変領域と2番目の抗体可変領域の間、及び3番目の抗体可変領域と4番目の抗体可変領域の間に制限酵素切断部位が存在する遺伝子を得ることができる。このような遺伝子において、1番目と2番目の抗体可変領域の間及び3番目と4番目の抗体可変領域の間を短いリンカーで、2番目と3番目の抗体可変領域の間を長いリンカーで結合し、且つ、1番目が第一の抗原に対する重鎖可変領域、2番目が第二の抗原に対する軽鎖可変領域、3番目が第二の抗原に対する重鎖可変領域、そして4番目が第一の抗原に対する軽鎖可変領域の順で並んでいると、これを発現させた場合に二特異性単鎖ダイアボディを得ることができる。

本発明は、このような遺伝子を含むベクター及びライブラリー、並びに、該遺伝子によりコードされるペプチドを含むものである。

【 0 0 4 0 】

本発明はまた、

(a)抗原に対する軽鎖可変領域と重鎖可変領域を、制限酵素切断部位が2つ以上存在する長いリンカーにより結合した抗体ファージライブラリーを作成する工程

(b)上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子を制限酵素で処理する工程、及び

(c)上記処理により得られたフラグメントをセルフライゲーションすることにより、可変領域間のリンカーを短いリンカーにする工程

を含む抗体ライブラリー又は発現ベクターの作成方法を提供する。この方法により、本発明のscDbライブラリーの作成方法を一特異性Dbへ応用することができる。例えば、ファージライブラリー構築時にリンカー内に例えば、下記のようなBa

mHIサイト(下線部)を二箇所設けておく。

【0041】

GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (配列番号: 3)
GGTGGTGGTGGATCCGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGTGGTGGATCC (配列番号: 4)

【0042】

次に、上記ファージライブラリー又は該ファージライブラリーから調製された可変領域を含む遺伝子（例えば、パンニング等で濃縮したそれぞれのライブラリーのファージミドあるいは上記ファージライブラリーからPCRを用いて増幅した遺伝子など）を、BamHIで処理し、自己閉環させることでリンカーの長さをscFv用の20残基からダイアボディに最適の5残基

(“GGTGGTGGTGGATCC (配列番号: 5) ”

によりコードされる“GlyGlyGlyGlySer (配列番号: 6) ”)にすることが出来る。こうして出来た受容体結合抗体を含むVL-VH断片を適当な発現ベクターに挿入することによって生物活性を指標にDbをスクリーニングすることが出来る。例えば、サイトカイン受容体に対する抗体ライブラリーを用いて構築したDbライブラリーをレトロウイルスベクターに挿入し、目的サイトカイン依存性増殖細胞に感染させることによってアゴニストDbを選択することができる。

【0043】

本発明のscDbは、従来知られている多特異性抗体と同様に、免疫診断、治療及び免疫学的検定による診断等の臨床分野において有用である。例えば、腫瘍細胞を殺す等の細胞障害性を誘起するため、ワクチンアジュバントとして、血栓溶解剤等の薬剤を適切に生体内において標的に対して運搬するため、酵素により活性化されるプロドラッグを標的部位において確実に変換するため、感染性の疾患の治療用に、細胞表面受容体に対して免疫複合体を誘導するため、免疫毒素等を腫瘍細胞等の標的細胞に運搬するため等、様々な治療目的が考えられる。

【0044】

このような治療目的で使用される本発明のDbを含む医薬組成物は、必要に応じ、それらに対して不活性な適当な薬学的に許容される担体、媒体等と混和して製剤化することができる。例えば、滅菌水や生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防

止剤(アスコルビン酸等)、緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、防腐剤、界面活性剤(PEG、Tween等)、キレート剤(EDTA等)、結合剤等を挙げることができる。また、その他の低分子量のポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチンや免疫グロブリン等の蛋白質、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン及びリシン等のアミノ酸、多糖及び単糖等の糖類や炭水化物、マンニトールやソルビトール等の糖アルコールを含んでいてもよい。注射用の水溶液とする場合には、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール(エタノール等)、ポリアルコール(プロピレングリコール、PEG等)、非イオン性界面活性剤(ポリソルベート80、HCO-50)等と併用してもよい。

【0045】

また、必要に応じ本発明のDbをマイクロカプセル(ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ[メチルメタクリル酸]等のマイクロカプセル)に封入したり、コロイドドラッグデリバリーシステム(リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等)とすることもできる("Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照)。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、本発明のDbに適用し得る(Langer et al., J.Biomed.Mater.Res. 15: 167-277 (1981); Langer, chem.Tech. 12: 98-105 (1982); 米国特許第3,773,919号; 欧州特許出願公開(EP)第58,481号; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP第133,988号)。

【0046】

患者への投与は、好ましくは注射や点滴により行われ、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等のほか、鼻腔内、経気管支、筋内、経皮または経口等の経路により当業者に公知の方法により行い得る。投与量は、患者の体重、年齢、疾病の種類、症状、投与方法等の種々の要因により変化するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することができる。

【0047】

また、本発明のDbをコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝

子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、nakedプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか(Adolph『ウイルスゲノム法』, CRC Press, Florida (1996)参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆(W093/17706等)して投与することができる。しかしながら、生体内においてDbが発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路(静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、添鼻薬等粘膜経路を介する方法等)により十分な量が投与される。ex vivoにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法(米国特許第4,945,050号)、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髓由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明のDbをコードする遺伝子を投与してもよい。

【0048】

本発明のDbは酵素免疫分析に用いることもできる。このためには、Dbの一方の抗体可変領域は酵素上の酵素活性を阻害しないエピトープを、そして他方は担体に結合するような担体を認識するように設計する。例えば、IgG、フェリチン、HRP及びホルモン等を認識するDbを挙げることができる。

【0049】

また、本発明のDbはin vivo及びin vitroにおける種々の疾病の免疫診断に用いることも可能である。例えば、Dbの一方の抗体可変領域を腫瘍細胞に特異的な抗原等を認識するようにし、他方は検出可能なマーカーに結合するように設計することができる。検出可能なマーカーとしては放射性同位体(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 等)、蛍光色素(フルオレセイン、ルシフェリン等)、化学ルミネセンス化合物(イソチオシアネート、ローダミン等)、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、HRP等の汎用の酵素等を挙げることができ、Dbのこれらの物質との結合及び検出は公知の方法に従って行うことができる(Hunter et al., Nature 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry 13: 1014 (1974); Pain

et al., J.Immunol.Meth. 40: 219 (1981); Nygen, J.Histochem and Cytochem 30: 407 (1982)参照)。

【 0 0 5 0 】

このように検出可能な物質に対して反応性を有する本発明のDbは、拮抗的結合分析、直接的及び間接的なサンドイッチ免疫分析(ELISA等)、免疫沈降分析(Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", pp.147-158, CRC Press Inc. (1987))等を含む、種々の分析において用いることができる。

【 0 0 5 1 】

【発明の効果】

本発明により、新規な二特異性scDbライブラリーの構築法が提供される。本発明の方法により、二特異性scDbライブラリーをscFvのファージライブラリーから煩雑な処理なしに一括処理により作成することができる。また、本発明は、ファージ抗体ライブラリーからパニング等によって濃縮した抗体クローンを一括して動物細胞用の発現ベクターに移す方法を提供するものである。

【 0 0 5 2 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> A method for scDb library construction

<130> C1-A0203

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 1

ggtggtggtg gatccggtgg tggtggttct ggcggcggcg gctccggagg tggtggttct 60

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 2

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 3

ggtggtggtg gatccggtgg tggtagttct ggcggcggcg gctccggagg tggtagatcc 60

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 5

ggtggtggtg gatcc

15

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

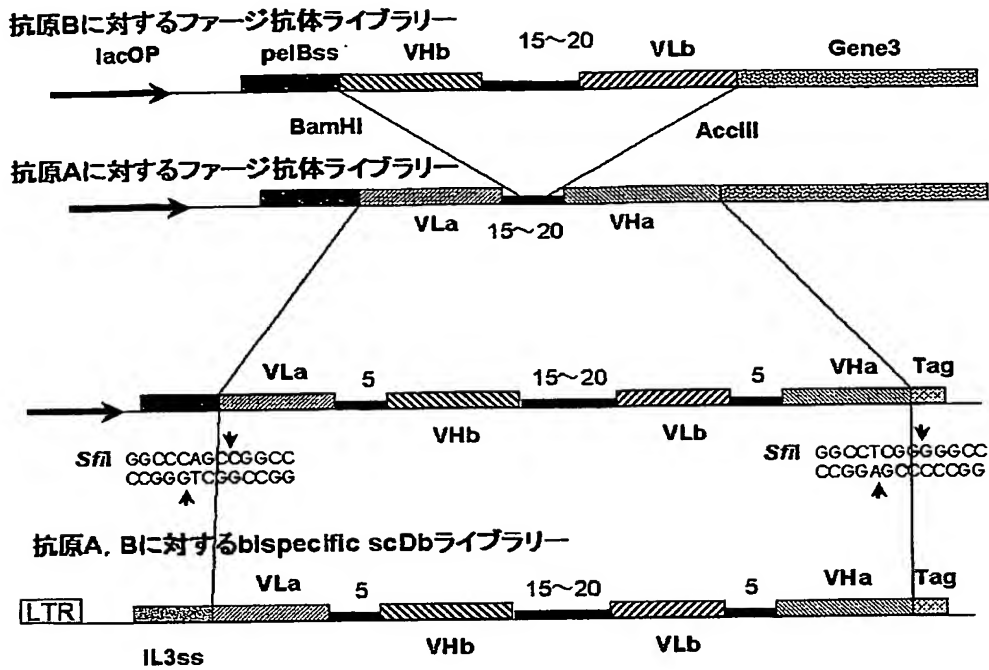
【図面の簡単な説明】

【図 1】 抗原A、Bに対する二特異性scDbライブラリーの構築方法を概略的に示す図である。

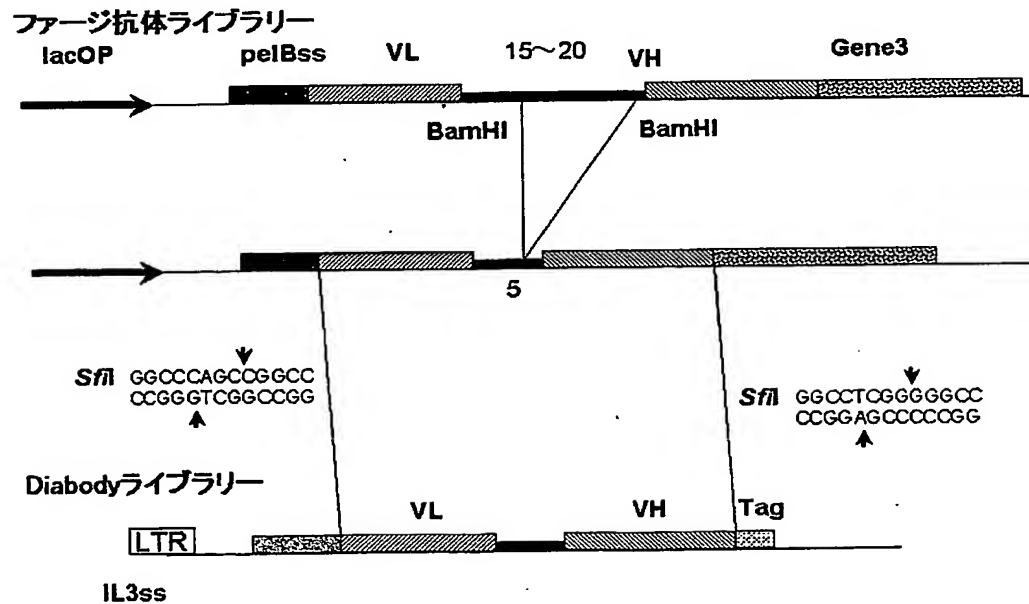
【図 2】 ファージ抗体ライブラリーからのDbライブラリーの構築方法を概略的に示す図である。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



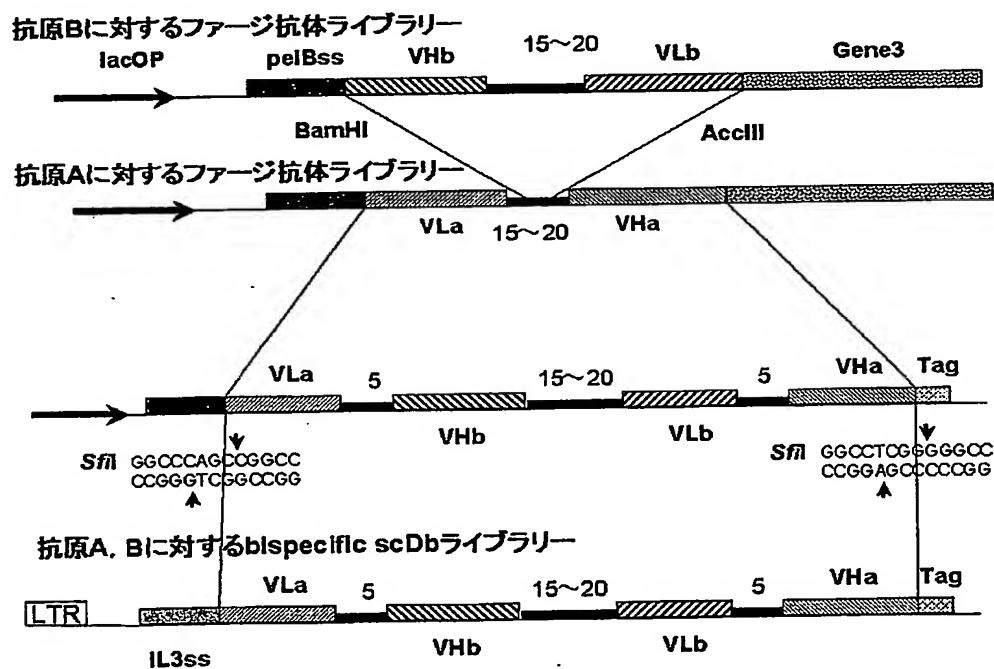
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 二特異性Dbにおいては、2種類の鎖の汲み合わせは3通りあるため、得られる二特異性Dbは全体の50%に留まる。一方、抗原との結合性により選択されたファージ抗体ライブラリー由来のscFvのVHとVLを二特異性scDbとして発現させるためには、リンカーの長さをscFvの発現に必要とされる15残基程度のものから、Dbの発現を可能にする5残基程度の長さのリンカーに換えるためのPCRアセンブル等の煩雑な操作が必要となり、一括処理することは困難であった。

【解決手段】 制限酵素部位を抗原コード領域に対して適切に配置することにより、二特異性Dbライブラリーを効率的に、煩雑な操作を用いずにscFvライブラリーより一括処理により構築することが可能となった。

【選択図】 図1



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日

1990年 9月 5日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名

中外製薬株式会社